

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M-1+

09/763175
PCT/JP99/04450

JP99/4450

19.08.99

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 08 OCT 1999	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 8月20日

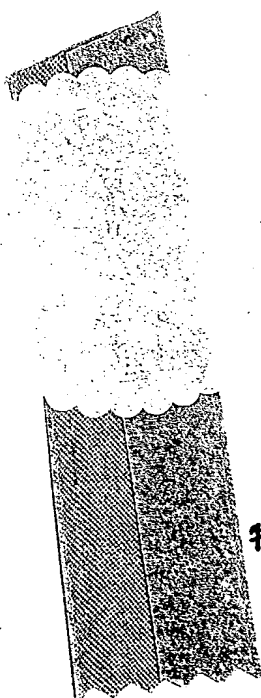
出願番号
Application Number:

平成10年特許願第233729号

出願人
Applicant(s):

中外製薬株式会社

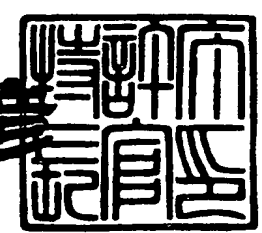
PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3064041

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-003

【提出日】 平成10年 8月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 腫瘍に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法

【請求項の数】 11

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市守山区天子田2-1402 トーカンマ
 ンション天子田502

 【氏名】 清井 仁

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区鶴舞4-4-3

 【氏名】 直江 知樹

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県安城市小堤町16-21

 【氏名】 唐渡 雅行

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金6-16-20-406

 【氏名】 北村 俊雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

 【代表者】 永山 治

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腫瘍に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、

(c) 該細胞の増殖を検出する工程、および

(d) 該細胞の増殖を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項2】 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、

(c) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を検出する工程、および

(d) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項3】 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、

(b) 該細胞を非ヒト哺乳類動物に接種して腫瘍を形成させる工程、

(c) 該細胞を接種する前あるいは接種後に被検試料を該非ヒト哺乳類動物に投与し、腫瘍の形成を検出する工程、および

(d) 該非ヒト哺乳類動物の腫瘍の形成を抑制する化合物を選択する工程、

を含む方法。

【請求項 4】 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) FLT3/ITDの発現によって分化誘導能が抑制された動物細胞を提供する工程

(b) 該細胞に対して被検試料を接触させて培養する工程、

(c) 該細胞の分化誘導能を検出する工程、および

(d) 該細胞の分化を促進する化合物を選択する工程、

を含む方法。

【請求項 5】 腫瘍が造血器腫瘍である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 造血器腫瘍が急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 サイトカインが IL3 である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 動物細胞が血球系細胞である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 血球系細胞が FDC-P1 細胞、32D 細胞または BaF3 細胞である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 動物細胞が 32D 細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 11】 請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法により単離する、腫瘍に対する医薬品候補化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腫瘍、特に造血器腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法に関する。より詳しくは、血球系細胞等の動物細胞における FLT3/ITD の機能を抑制する化合物のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

FLT3は、KIT、FMS、およびPDGFRなどと共に、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)のクラスIIIに属するタンパク質で、造血系に関与していると考えられている(O.Rosnetら,1991,Genomics 9:380-385, O.Rosnetら,1991, Oncogene 6:1641-1650, W.Matthewsら,1991,Cell 65:1143-1152, O.Rosnetら,1993,Blood 82:1110-1119)。構造的には、RTKは5個のイムノグロブリン様ドメインからなる細胞外領域と、1つの膜近傍領域(JMドメイン)、キナーゼ挿入ドメイン(KIドメイン)に挟まれた2つのチロシンキナーゼドメイン(TK1およびTK2)、および、C末端ドメインを有する。FLT3は、脳、胎盤、肝臓に加え、造血幹細胞において強く発現している(O.Rosnetら,1991, Oncogene 6:1641-1650, W.Matthewsら,1991,Cell 65:1143-1152, O.Rosnetら,1993,Blood 82:1110-1119, L.S.Rusten,1996,87:1317-1325)。FLT3のリガンド(FL)は骨髄のストローマ細胞から発現され、膜結合型と可溶型が存在し、単独あるいは他のサイトカインと共働して幹細胞を刺激する(C.Hannumら,1994,Nature 368:643-648, H.J.McKennaら,1995,Blood 86:3413-3420, F.Hirayama,1995,Blood 85:1762-1768, M.Lisovskyら,1996,Leukemia 10:1012-1018)。従って、FLとFLT3によるリガンド-受容体の相互作用は、造血系において重要な機能を果たしていると考えられる。

【0003】

一方、急性骨髄性白血病(AML)や急性リンパ性白血病(ALL)患者の試料では、ほとんどの場合FLT3の高発現が観察され、慢性骨髄性白血病(CML)でもFLT3の高発現が見られる。また、FLの刺激により、ALL細胞よりもAML細胞の増殖が顕著に高まることが知られている(W.Piacibelloら,1995,Blood 86:4105-4114, A.Stacchiniら,1996,Leukemia 10:1584-1591, M.Lisovskyら,1996,Blood 88:3987-3997, F.Birgら,1992,Blood 80:2584-2593, U.Dehmelら,1996,Leukemia 10:261-270)。このことから、FLT3は、骨髄系の細胞に特異的な機能を有している可能性が考えられている。また、幾つかの白血病-リンパ腫細胞株では、FLT3とFLの両方が発現しており(N.DaSilvaら,1994,Leukemia 8:885-888, G.Meierhoff,1995,Leukemia 9:1368-1372)、自己分泌(autocrine)または傍分泌(paracrine)の機構が示唆されている(H.G.Drexler,1996,Leukemia 10:588-599)。

【0004】

近年、癌におけるサイトカイン受容体の変異が注目されている。今日までに、ヒトの白血病で、c-fmsやc-kitの変異が報告されている(B.LowenbergおよびI.P.Touw,1993,Blood 81:281-292)。変異c-fmsをトランスフェクトしたマウスNIH3T3細胞はリガンド非依存的なトランスフォーメーションを起こす(M.Rousselら,1988,Cell 55:979-988)が、ほとんどの白血病患者の細胞で、fmsのリガンドであるM-CSFは、増殖を僅かしか上昇させないことから、FMSの変異の重要性はまだよくわかっていない(B.LowenbergおよびI.P.Touw,1993,Blood 81:281-292)。また、KITとそのリガンドであるSCFは白血病細胞や幹細胞を増殖させる(B.LowenbergおよびI.P.Touw,1993,Blood 81:281-292, O.Witte,1990,Cell 63:5-6)。しかしながら、マスト細胞白血病細胞株にはc-kit遺伝子の変異が見つかった(T.Tsujimuraら,1994,Blood 83:2619-2626, H.Kitayama,1996,Blood 88:995-1004, Y.Tsujimuraら,1996,Blood 87:273-283)ものの、臨床試料では未だ十分確認されていない。

【0005】

最近、AML患者の中に、FLT3の体細胞変異が発見された(M.Nakaoら,1996,Leukemia 10:1911-1918)。これらの変異体は、FLT3遺伝子のJMドメインをコードしている領域が直列に重複(ITD; internal tandem duplication)していた。重複配列は、主にエクソン11/12およびイントロン11を含んでおり、その長さは試料によって様々であったが、それらは読み枠がインフレームであり、蛋白に翻訳可能で長いJMドメインを有している点が共通していた。

【0006】

FLT3変異は、AML患者の約20%、骨髓異形成症候群(MDS)患者の約3%に見られ、慢性骨髄性白血病(CML)やリンパ性造血器腫瘍の患者には見られない(S.Yokotaら,1997,Leukemia 11:1605-1609)。AMLの患者において、ITDを有する変異FLT3遺伝子(以後FLT3/ITDと記す)が、本発明者らの知見によれば、診断時には見られなくて、再発時に見られる例があることから、FLT3/ITDが白血病の進行と関わっていることが示唆される。しかしながら、白血病の進行におけるFLT3/ITDの機能についてはいまだ何ら報告されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、白血病などの造血器腫瘍におけるFLT3/ITDの機能を解明し、FLT3/ITDの機能の抑制を指標とした、造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、血球系細胞株におけるFLT3/ITDの機能の検討を行い、該細胞株において、FLT3/ITDのチロシン残基が恒常的にリン酸化されていること、および、FLT3/ITDを導入した血球系細胞が、IL3非依存的な増殖を示すこと、更に、同系マウスに接種することにより、腫瘍が形成されることを見出した。これら事実、FLT3/ITDのチロシン残基のリン酸化を介する、FLT3/ITDからの増殖シグナルにより、IL3非依存的な細胞増殖が引き起こされ、これが特に急性骨髄性白血病などの造血器腫瘍の進行に関係していることを示唆した。このため、本発明者らはFLT3/ITDの機能の抑制を指標として造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。

【0009】

本発明は、特に、血球系細胞におけるFLT3/ITDの機能を抑制を指標とした、造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関し、より具体的には、

- (1) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、
 - (c) 該細胞の増殖を検出する工程、および
 - (d) 該細胞の増殖を抑制する化合物を選択する工程、
- を含む方法、

- (2) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、
 - (c) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を検出する工程、および
 - (d) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (3) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞を非ヒト哺乳類動物に接種して腫瘍を形成させる工程、
 - (c) 該細胞を接種する前あるいは接種後に被検試料を該非ヒト哺乳類動物に投与し、腫瘍の形成を検出する工程、および
 - (d) 該非ヒト哺乳類動物の腫瘍の形成を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (4) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) FLT3/ITDの発現によって分化誘導能が抑制された動物細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞に対して被検試料を接触させて培養する工程、
 - (c) 該細胞の分化誘導能を検出する工程、および
 - (d) 該細胞の分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (5) 腫瘍が造血器腫瘍である、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、
- (6) 造血器腫瘍が急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群である、(5)に記載の方法、
- (7) サイトカインがIL3である、(1)から(3)のいずれかに記載の方法、
- (8) 動物細胞が血球系細胞である、(1)から(4)のいずれかに記載の方

法、

(9) 血球系細胞がFDC-P1細胞、32D細胞またはBaF3細胞である、(8)に記載の方法、

(10) 動物細胞が32D細胞である、(4)記載の方法、

(11) (1)から(10)のいずれかに記載の方法により単離しうる、腫瘍に対する医薬品候補化合物、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、腫瘍、特に造血器腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法に関する。実施例に示したように、FLT3/ITDを導入した幼若顆粒球系細胞株FDC-P1(ATCC CRL-12103)において、FLT3/ITDのチロシン残基のリン酸化が検出された(実施例3)。また、親細胞のFDC-P1はIL3依存性であるのに対して、FLT3/ITDを導入したFDC-P1はIL3非依存的な増殖を示すことが判明した(実施例4)。これら事実、FLT3の直列重複(ITD)変異が、血球系細胞の腫瘍化に機能的に関わっていることを初めて明らかにするものである。本発明者らは、上記したFLT3/ITDの機能を阻害することによって、細胞の異常増殖を抑制し、白血病等の造血器腫瘍を含む腫瘍の治療を行うことが可能であることを見出した。

【0011】

従って、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の一つの態様は、FLT3/ITDを発現させた血球系細胞等の動物細胞の増殖の抑制を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a)FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、(b)該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、(c)該細胞の増殖を検出する工程、および(d)該細胞の増殖を抑制する化合物を選択する工程、を含む。

【0012】

また、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の他の一つの態様は、血球系細胞等におけるFLT3/ITDのチロシン残基のリン酸化の抑制を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a)FLT3/ITDの発

現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、(c) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を検出する工程、および(d) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程、を含む。

【0013】

さらに、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の他の一つの態様は、FLT3/ITDを発現させた血球系細胞等の動物細胞による腫瘍の形成の抑制を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、(b) 該細胞を非ヒト哺乳類動物に接種して腫瘍を形成させる工程、(c) 該細胞を接種する前あるいは接種後に被検試料を該非ヒト哺乳類動物に投与し、腫瘍の形成を検出する工程、および(d) 該非ヒト哺乳類動物の腫瘍の形成を抑制する化合物を選択する工程、を含む。

【0014】

また、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の他の一つの態様は、FLT3/ITDを発現させた血球系細胞等の動物細胞の分化誘導能、即ち該細胞の分化を促進する作用を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a) FLT3/ITDの発現によって分化誘導能が抑制された動物細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対して被検試料を接触させて培養する工程、(c) 該細胞の分化誘導能を検出する工程、および(d) 該細胞の分化を促進する化合物を選択する工程、を含む。なお、細胞の分化を促進する化合物としては、単独で該細胞の分化を促進するものであっても、細胞の分化を促進することが知られている既知のサイトカインと協調して促進するものであってもよい。

【0015】

本発明においてスクリーニングされる医薬品候補化合物の対象とする腫瘍としては、FLT3の直列重複(ITD)変異に起因する腫瘍であれば特に制限はなく、中でも造血器腫瘍、例えば、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群が挙げられ、特に、急性骨髄性白血病が対象疾患として好適である。

【0016】

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、オリゴヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに制限されない。

【0017】

スクリーニングに利用する細胞としては、FLT3/ITDの発現によって、サイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞または分化誘導能が抑制された動物細胞であれば制限はないが、血球系細胞（造血幹細胞を含む）が好適である。例えば、FLT3/ITDの発現によってIL3非依存的な増殖を示すFDC-P1細胞（ATCC：CRL-12103）、32D細胞（理研細胞バンク：RCB1145）、Ba/F3細胞（理研細胞バンク：RCB0805）、DA-3細胞（理研細胞バンク：RCB1144）等が挙げられる。特に、FDC-P1細胞、32D細胞、Ba/F3細胞が好適である。細胞内でのFLT3/ITDの発現は、当業者に公知の遺伝子操作技術により行うことができる。細胞内で発現させるFLT3/ITDとしては、サイトカイン非依存的に血球系細胞の増殖を誘導しうるものであればよく、例えば、配列番号：2、4、6または8に記載のアミノ酸配列を有するFLT3/ITDを用いることができる。また、文献(S. Yokotaら,1997,Leukemia 11: 1605-1609、H. Kiyoiら,1997,Leukemia 11: 1447-1452)に記載のFLT3/ITD配列を用いることもできる。その他、造血器腫瘍の患者から新たに得られるFLT3/ITDを用いることもできる。また、FLT3/ITDは、人工的に合成したものであっても、細胞由来のものであってもよい。

細胞への被検試料の接触は、被検試料の種類に応じて、被検試料の細胞培養培地への添加や被検試料の細胞内への導入などの方法で行うことができる。

以下①から④に具体的なスクリーニング方法の一例を示すが、本発明の方法はこれに制限されない。

【0018】

① 正常FLT3またはFLT3/ITDを市販のネオマイシン耐性遺伝子などの選択マーカーを含む発現ベクターに組み込み、Bio-Rad Gene Pulser Cuvettes（バイオラド）等を用いてFDC-P1細胞や32D細胞等へ導入する。FLT3/ITD導入細胞を選択後、 5×10^4 個程度の細胞を24wellプレート上に播き、被検試料存在下または非存

在下で37℃、CO₂インキュベータ中にて培養し、2～3日後に生細胞数をトリパンプルーまたはMTTアッセイ等により計測し、細胞の増殖を抑制する化合物を選択することができる。

【0019】

② 正常FLT3またはFLT3/ITDを市販のネオマイシン耐性遺伝子などの選択マーカーを含む発現ベクターに組み込み、Bio-Rad Gene Pulser Cuvettes (バイオラド) 等を用いてFDC-P1細胞や32D細胞等へ導入する。FLT3/ITD導入細胞を選択後、 1×10^6 個程度の細胞を10cmプレート上に播き、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加え、被検試料存在下または非存在下で37℃、CO₂インキュベータ中にて培養する。その後、細胞抽出物を調製し、抗FLT3抗体および抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降後、電気泳動を行い、オートラジオグラフィーでFLT3/ITD中の放射性同位元素を検出することで、FLT3のチロシンリン酸化を抑制する化合物を選択することができる。

【0020】

③ FLT3/ITDを上記①のようにして導入して形質転換したFDC-P1細胞を 2×10^7 個程度、FDC-P1細胞が樹立されたマウスDBA2 (ストレイン) の皮下に接種したところ、接種後、該マウスは約2週間で腫瘍を形成した。形成された腫瘍にFLT3/ITDのDNAおよび蛋白質がそれぞれ発現していることを確認した (図3A及びB)。その際、特に放射線照射などの処理を施さなくとも腫瘍が形成された。すなわち、FLT3/ITDで形質転換した血球系細胞等を、該細胞と同系のマウスなどの非ヒト哺乳類動物に接種するとFLT3/ITDによる腫瘍が形成される。したがって、この非ヒト哺乳類動物に、形質転換した血球系細胞等を接種する前、あるいは、接種後に被検試料を経皮、経静脈または経口的に投与し、腫瘍の形成あるいは消長を調べることによって腫瘍の増殖を抑制する化合物を選択することができる。

【0021】

④ また、本発明者らは、例えば32D細胞は、IL3依存性細胞でありG-CSFの存在下で分化が誘導されるが、FLT3/ITDを導入するとG-CSFによる上記分化誘導が抑制されることを見出している。したがって、正常FLT3またはFLT3/ITDを上記①のようにして導入して形質転換した血球系細胞等を 5×10^4 個程度24wellプレートにまき、被検試料を添加して経時的にサイトスピン標本を作成し、メイギムザ染

色、ペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色またはアルカリフォスファターゼ染色などにより、分化誘導能を調べるか、あるいは、フローサイトメトリーにてCD11b、CD13、CD14、CD33などの発現を調べることにより分化誘導能を調べることにより、分化誘導能を促進する化合物を選択することができる。

【0022】

なお、細胞増殖を指標としたスクリーニング系においては、非選択的細胞毒性物質の影響を除外するため、親細胞をIL3存在下で培養し、被検化合物を加え、IL3依存性増殖に対する被検化合物の影響を同時に調べることが好ましい。

【0023】

本発明におけるスクリーニングにより単離される化合物としては、種々の作用点を有するものが考えられる。例えば、FLT3/ITDに直接作用してその機能を阻害するもの、FLT3/ITDまたはリン酸化FLT3/ITDに結合する分子（例えば、SHC、Grb2、Cbl、PI3K、RAS-GAP、PLC- γ などのアダプタータンパク質など）に作用して間接的にFLT3/ITDの機能を阻害するもの、FLT3/ITDから細胞増殖に至るまでのシグナル伝達に関与するタンパク質群に作用するもの、FLT3/ITDのリン酸化を行うタンパク質に作用してその機能を阻害するもの、FLT3/ITDからそのリン酸化に至るまでのシグナル伝達に関与するタンパク質群に作用するもの、恒常的にリン酸化しているFLT3/ITDを脱リン酸化するものが含まれる。

【0024】

これら化合物は、FLT3/ITDの発現が関与する上記造血器腫瘍等の治療薬の候補になる。スクリーニングされる化合物の中で、FLT3/ITDの機能を特異的に阻害し、正常FLT3の機能は阻害しない化合物は、FLT3/ITDに起因する上記疾患の特異的な治療薬となるため好ましい。

本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、医薬品として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者で

あれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

【0025】

【実施例】

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本発明において、「FLT3」と表記したときは、特に断らない限り、正常FLT3だけでなく、FLT3/ITDを含む変異FLT3をも意味する。また、「FLT3異常」とは、変異FLT3の発現に加え、正常FLT3の高発現などのあらゆるFLT3の異常を意味する。

【0026】

【実施例1】 白血病細胞のFLT3/ITDの検出

白血病細胞から、高分子DNAを単離し、FLT3タンパク質のJM領域を含むDNA断片を文献(H. Kiyoi, Leukemia 11: 1447-1452, 1997)記載の方法を用いてPCRにて増幅した。正常なサイズと異なるバンドをアガロースゲルから切り出し、Qiaex gel extraction kit (キアゲン社)で精製した後、メーカーの説明書に従ってpMOSBlue Tベクター(アマシャム社)へクローニングした。組換えコロニー10種類をLB培地で培養し、プラスミドDNAをQIAprep spin plasmid miniprep kit (キアゲン社)で調製し、塩基配列をシークエンスにより確認した。FLT3 mRNAの発現は文献(H. Kiyoi, Leukemia 11: 1447-1452, 1997)記載の方法に従って、RT-PCRにて確認した。正常なサイズを示さないバンドを上記の方法でクローン化し、シークエンスにより配列を確認した。

その結果判明した、種々の造血器腫瘍におけるFLT3/ITDの出現頻度(FLT3/ITDの見られた症例数/検索症例数)を表1にまとめた。

【表1】

診断	出現頻度	診断	出現頻度
ALL	0/48	AML(全体)	35/221
ATL	0/14	M0	0/2
CLL	0/15	M1	5/18

ET	0/3	M2	4/29
ML	0/16	M3	16/124
MM	0/38	M4	6/24
Histiocytosis	0/1	M5	4/20
CML-BC	0/13	M6	0/1
CMMoL	0/17	M7	0/3
MDS	1/15		

FLT3/ITDは造血器腫瘍の中でもAMLに特異的に見られることが確認され、その割合はAMLの約20%と効率であった。また、MDSにも見られたが、その割合は約3%と低かった。

【0027】

[実施例2] FLT3/ITD発現プラスミドの血球系細胞への導入

白血病由来細胞より total RNA を抽出し、cDNA を合成後、これを鋳型として、変異FLT3 cDNA のタンデムリピート領域を含むMunI-EcoRV断片をRT-PCRにて増幅した。プライマーにはMunI-Fプライマー(配列番号: 11/5'-CAACAATTGGTGTGTTG TCTCCTCTT-3')およびEcoRV-Rプライマー(配列番号: 12/5'-CATGATATCTCGAGCCA ATCCAAAG-3')を用いた。増幅した断片はMunIおよびEcoRV(ベーリンガーマンハイム山之内社)により切断し、アガロースゲルで分離後、前述の方法で精製した。正常FLT3 cDNAの全長(0. Rosnetら, 1993, Blood 82:1110-1119; Accession No.S6 4785)を有する発現ベクターpCDHF3(Olivier Rosnet博士より供与)をMunIおよびEcoRVで切断し、精製したFLT3/ITD遺伝子断片を挿入した。4種のFLT3/ITD (Mt1、Mt2、Mt3およびMt4)を用いた。Mt1~Mt4の変異領域の塩基配列をそれぞれ配列番号: 1、3、5および7に示し、そのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: 2、4、6および8に示した。Mt1からMt4の発現ベクターを使用して、血球系細胞へのトランスフェクションを行った。

得られたFLT3/ITD発現プラスミドは、血球系細胞へ以下のように導入した。すなわち、Bio-Rad Gene Pulser Cuvettes (バイオラド社)を用い、pBabe-neoベクター(Nucleic Acids Res., 18:3587-3596, 1990)と10:1の割合でコトランスフ

エクト (300 Volts, 960 μ F) し、800ng/mlのネオマイシンで選択を行い、クローニング後、FACSおよびウェスタンブロットにてFLT3の発現を確認してトランスフェクトしたクローンを樹立した。

FLT3/ITD遺伝子を導入する細胞としては、幼若顆粒球系のFDC-P1細胞を用いた。

【0028】

【実施例3】 トランスフェクタントのFLT3分子チロシンリン酸化

(1) 10%FCSを含むRPMI1640培地 (GIBCO社) にてトランスフェクタントを培養し、 2×10^7 個の細胞を1000 rpm 5分にて回収し、PBSにて洗浄後、細胞ペレットをリシスバッファー (20mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, Nonidet P-40, 50mM NaF, 10mg/ml aprotinin, 10mg/ml leupeptin, 1mM Na_3VO_4 , 50mM Na_2MoO_4 , 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) に溶解、4℃、1時間後、15000 rpm 30分間遠心し、上清にウサギ抗ヒトFLT3抗体 (Santa Cruz Biotechnology社, Santa Cruz, CA, USA) を加え、4℃ 2時間回転撹拌し、Protein A/G Plus agarose (Santa Cruz) を加え4℃ 2時間回転撹拌後、リシスバッファーにて3回洗浄し、サンプルローディングバッファー (0.125M Tris-HCl, pH6.8, 10% 2-メルカプトエタノール, 4% SDS) に溶解し、SDS-PAGEにて電気泳動後、Immobilon PVDF membrane (ミリポア社) に転写し、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10, Upstate Biotechnology社, Lake Placid, NY, USA) にて反応後、ECLシステム (アマシャム社) にてバンドを検出した。同じ膜をストリッピングバッファー (100mM 2-メルカプトエタノール, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH6.8) にて70℃ 30分インキュベートした後、ウサギ抗ヒトFLT3抗体 (Santa Cruz Biotechnology社, Santa Cruz, CA, USA) にて再度反応させ、FLT3蛋白の確認を行った。

FDC-P1細胞の結果を図1に示す。図1に示されるように、FDC-P1細胞に導入されたいずれのFLT3/ITDも、チロシン残基がリン酸化されており、FLT3/ITDは恒常的にFLT3/ITDのチロシン残基をリン酸化するシグナルが活性化されていることが判明した。また、正常FLT3タンパク質は、FL非存在下ではリン酸化されていなかった。

また、32D細胞において、FDC-P1細胞の場合と同様の結果が得られた。

【0029】

【実施例4】 FLT3/ITD導入細胞の増殖特性

正常FLT3(wt) またはFLT3/ITD (Mt1からMt4) を導入した 5×10^4 個のFDC-P1細胞を24ウェルプレート上に、次の4種の培地下で37℃、CO₂インキュベータ中にて培養し、トリパンブルーで染色し、生細胞数を24時間毎4日間計数し、各細胞の増殖能を測定した。

培養条件は、

1. 10%FCSRPMI1640 のみ (図2左上)
2. 10%FCSRPMI1640 + 1ng/ml マウスIL3 (Genzyme社) (図2右上)
3. 10%FCSRPMI1640 + 50ng/ml ヒトFL (Purotech社) (図2左下)
4. 10%FCSRPMI1640 + 1ng/ml マウスIL3 + 50ng/ml ヒトFL (図2右下)

の4条件で行った。その結果を図2に示す。図に示されたように、正常FLT3導入細胞は、IL3非存在下では増殖できず、FLT3のリガンドであるFLを加えた場合でも、IL3依存性は変化しなかった。また、IL3およびFLの相乗効果も認められなかった。それに対して、FLT3/ITD導入細胞は、IL3を加えない場合でも、IL3存在下と同等の増殖を示し、その増殖速度は、正常FLT3導入細胞にIL3を加えた場合よりも有意に高かった。また、IL3および/またはFLによる増殖促進作用、相乗効果は認められなかった。

これらのデータから、FLT3/ITDは幼若顆粒球細胞において細胞内の増殖シグナル経路を活性化し、サイトカイン非依存的な増殖を引き起こすことが判明した。

また、32D細胞において、FDC-P1細胞の場合と同様の結果が得られた。

【0030】

【発明の効果】

本発明により、FLT3/ITDの機能の抑制を指標とした、造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の方法により単離される化合物は、造血器腫瘍、特に急性骨髄性白血病における、FLT3/ITDの発現に起因する血球系細胞等の異常な増殖を抑制する効果が期待されるため、これら疾患に対する治療薬開発への利用が期待される。

【 0 0 3 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Methods for screening of therapeutic agents for malignancies

<130> C1-003

<160> 10

<210> 1

<211> 319

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<223> FLT3/ITD gene (Mt1); partial sequence.

<400> 1

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc 48

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1 5 10 15

tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat 96

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp

20 25 30

ctc aaa tgg gag ttt cca aga gaa aat tgc tcc tca gat aat gag tac 144
 Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Cys Ser Ser Asp Asn Glu Tyr
 35 40 45
 ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat ctc aaa tgg gag ttt 192
 Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe
 50 55 60
 cca aga gaa aat tta gag ttt ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt 240
 Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe
 65 70 75 80
 gga aaa gtg atg aac gca aca gct tat gga att agc aaa aca gga gtc 288
 Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val
 85 90 95
 tca atc cag gtt gcc gtc aaa atg ctg aaa g 319
 Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys
 100 105

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FLT3/ITD (Mt1); partial sequence. ITD region (42)..(68)

<400> 2

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp
 20 25 30

Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Cys Ser Ser Asp Asn Glu Tyr
 35 40 45
 Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe
 50 55 60
 Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe
 65 70 75 80
 Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val
 85 90 95
 Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys
 100 105

<210> 3

<211> 298

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(297)

<223> FLT3/ITD gene (Mt2); partial sequence.

<400> 3

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc 48
 Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser
 1 5 10 15
 tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat 96
 Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp
 20 25 30
 ctc aaa agc tcc tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa 144

Leu Lys Ser Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu
 35 40 45
 tat gaa tat gat ctc aaa tgg gag ttt cca aga gaa aat tta gag ttt 192
 Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe
 50 55 60
 ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt gga aaa gtg atg aac gca aca 240
 Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Met Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 gct tat gga att agc aaa aca gga gtc tca atc cag gtt gcc gtc aaa 288
 Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln Val Ala Val Lys
 85 90 95
 atg ctg aaa g 298
 Met Leu Lys

<210> 4

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FLT3/ITD (Mt2); partial sequence. ITD region (35)..(54)

<400> 4

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp
 20 25 30
 Leu Lys Ser Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu
 35 40 45

Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe

50

55

60

Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Met Asn Ala Thr

65

70

75

80

Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln Val Ala Val Lys

85

90

95

Met Leu Lys

<210> 5

<211> 271

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(270)

<223> FLT3/ITD gene (Mt3); partial sequence.

<400> 5

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc 48

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1

5

10

15

tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa atg gga 96

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Met Gly

20

25

30

atg ggg gga gaa tgt aat ccc ggg aga caa gat ctc aaa tgg gag ttt 144

Met Gly Gly Glu Cys Asn Pro Gly Arg Gln Asp Leu Lys Trp Glu Phe

35

40

45

cca aga gaa aat tta gag ttt ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt 192

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe

50

55

60

gga aaa gtg atg aac gca aca gct tat gga att agc aaa aca gga gtc 240

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val

65

70

75

80

tca atc cag gtt gcc gtc aaa atg ctg aaa g

271

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85

90

<210> 6

<211> 90

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FLT3/ITD (Mt3); partial sequence. ITD region (31)..(42)

<400> 6

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Met Gly

20

25

30

Met Gly Gly Glu Cys Asn Pro Gly Arg Gln Asp Leu Lys Trp Glu Phe

35

40

45

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe

50

55

60

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val

65

70

75

80

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85

90

<210> 7

<211> 271

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(270)

<223> FLT3/ITD gene (Mt4); partial sequence.

<400> 7

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc	48
Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser	
1 5 10 15	
tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gat gag tac	96
Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Asp Glu Tyr	
20 25 30	
ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat ctc aaa tgg gag ttt	144
Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe	
35 40 45	
cca aga gaa aat tta gag ttt ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt	192
Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe	
50 55 60	
gga aaa gtg atg aac gca aca gct tat gga att agc aaa aca gga gtc	240
Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val	
65 70 75 80	
tca atc cag gtt gcc gtc aaa atg ctg aaa g	271

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85

90

<210> 8

<211> 90

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FLT3/ITD (Mt4); partial sequence. ITD region (30)..(40)

<400> 8

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Asp Glu Tyr

20

25

30

Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe

35

40

45

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe

50

55

60

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val

65

70

75

80

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85

90

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for amplifying human FLT3/ITD genes.

<400> 9

caacaattgg tgtttgtctc ctctt

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for amplifying human FLT3/ITD genes.

<400> 10

catgatatct cgagccaatc caaag

25

【図面の簡単な説明】

【図 1】

正常FLT3およびFLT3/ITDを導入したFDC-P1細胞の、FLT3タンパク質のチロシン残基のリン酸化を示す図である。細胞抽出物をFLT3抗体で免疫沈降(IP:FLT3)し、SDS-PAGEの後、抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットを行った(上段; IB:pTyr)。さらに、同じ膜を抗FLT3抗体でウエスタンブロットを行った(下段; IB:FLT3)。レーン1: Mt1、レーン2: Mt2、レーン3: Mt3、レーン4: Mt4。

【図 2】

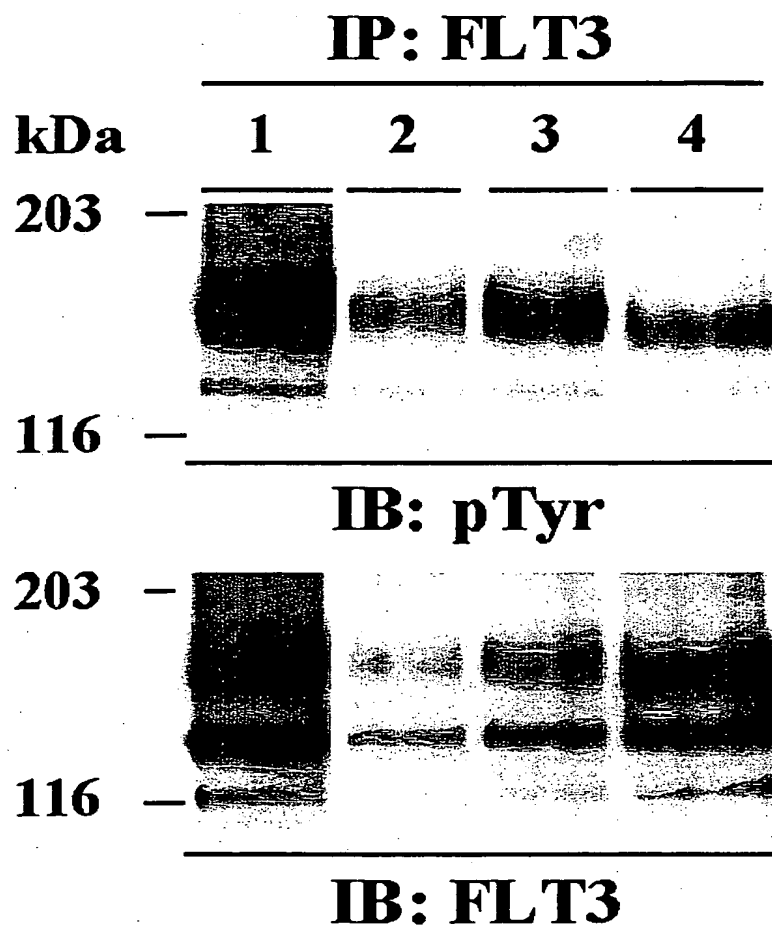
正常FLT3および4種のFLT3/ITDを導入したFDC-P1細胞の増殖特性を示す図である。各細胞を、IL3およびFLの非存在下（左上；IL3(-)/FL(-)）、IL3(1ng/ml)存在下（右上；IL3(1ng/ml)/FL(-)）、FL(50ng/ml)存在下（左下；IL3(-)/FL(50ng/ml)）、またはIL3およびFL存在下（右下；IL3(1ng/ml)/FL(50ng/ml)）の条件で培養した。

【図3】

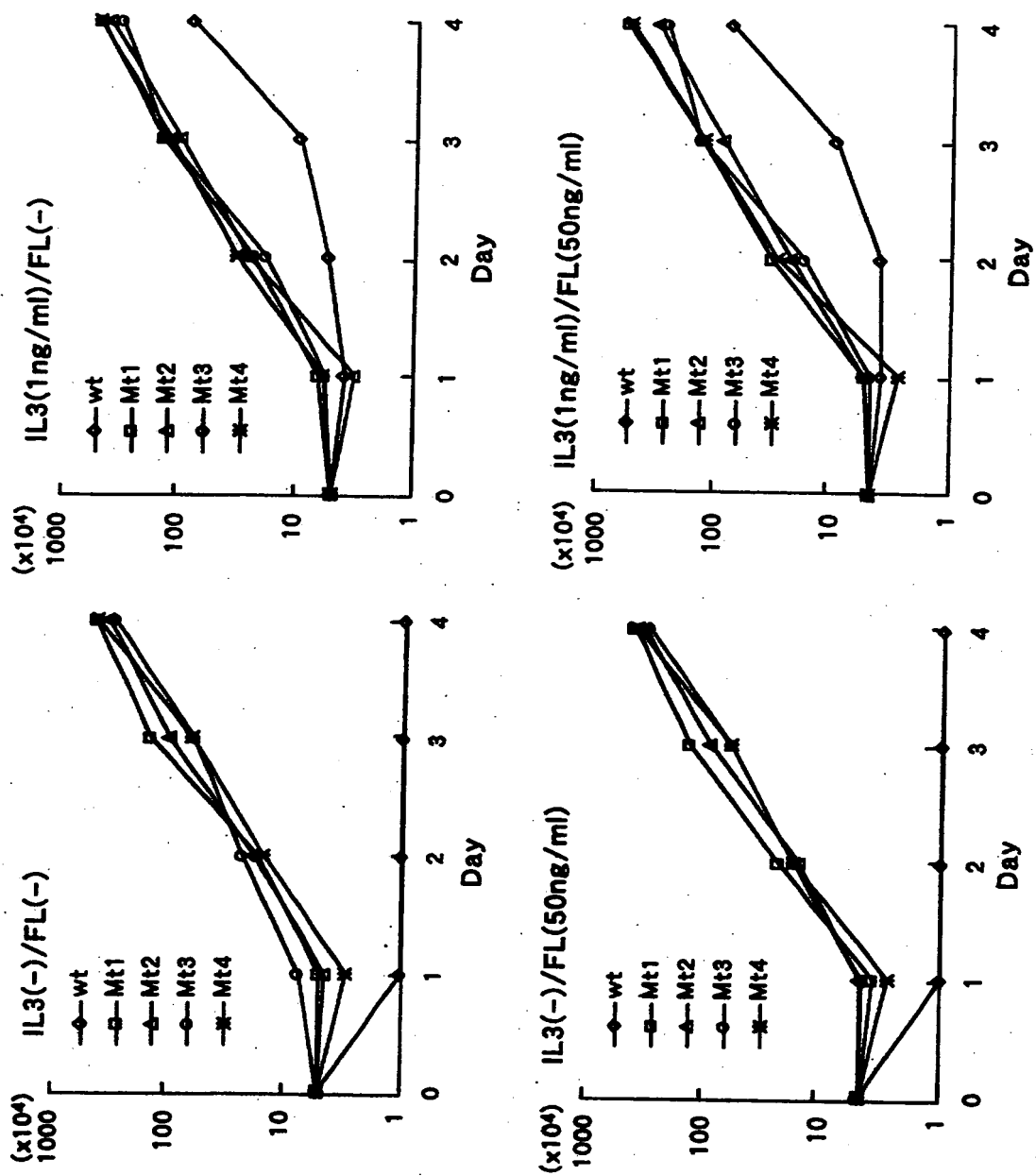
FLT3/ITDを導入したFDC-P1細胞をマウスDBA2の皮下に接種して形成された腫瘍にFLT3/ITDのDNAおよび蛋白質が発現していることを示す図である。AはDNAをPCRで増幅後電気泳動し、腫瘍にFLT3/ITDのDNAが存在していることを示している。Bは抗FLT3抗体を用いた全細胞抽出物のウェスタンブロットであり、腫瘍にFLT3/ITDの蛋白質が存在していることを示している。

【書類名】 図面

【図1】

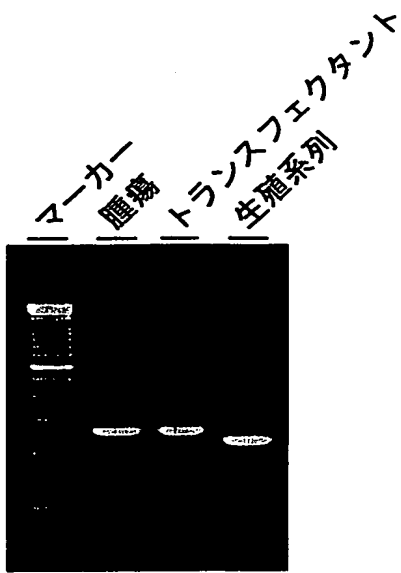


【図2】

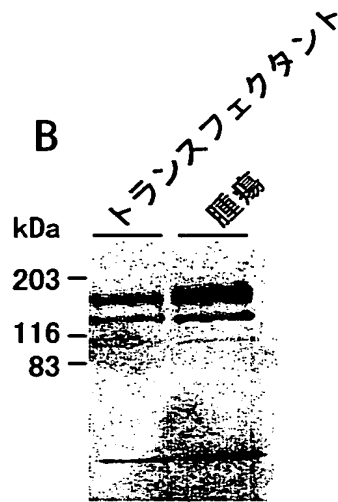


【図 3】

A



B



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 白血病などの造血器腫瘍におけるFLT3/ITDの機能を解明し、FLT3/ITDの機能の抑制を指標とした、造血器腫瘍を含む腫瘍に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 種々の造血器腫瘍におけるFLT3/ITDの出現頻度につき検討を行い、特に急性骨髄性白血病においてその頻度が高いことを見出した。また、血球系細胞株におけるFLT3/ITDの機能の検討を行い、該細胞株において、FLT3/ITDのチロシン残基が恒常的にリン酸化されていること、および、FLT3/ITDを導入した血球系細胞が、IL3非依存的な増殖を示すことを見出した。更に、FLT3/ITDを導入した血球系細胞は腫瘍形成能を有しており、また、細胞の分化が抑制されることを見出した。本発明者らはFLT3/ITDのこれらの機能の抑制を指標とした、腫瘍に対する医薬品化合物のスクリーニングが可能であることを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000003311

【住所又は居所】

東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

特平 10-233729

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社